

DOI: 10.11686/cyxb2025151

http://cyxb.magtech.com.cn

张钿, 冷华娟, 崔婧, 等. 紫花苜蓿突触结合蛋白家族成员鉴定与非生物胁迫下的表达分析. 草业学报, 2026, 35(4): 158—168.

ZHANG Tian, LENG Hua-juan, CUI Jing, *et al.* Identification of synaptotagmin gene family members in alfalfa and their transcript profiles under abiotic stresses. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(4): 158—168.

紫花苜蓿突触结合蛋白家族成员鉴定 与非生物胁迫下的表达分析

张钿^{1,2}, 冷华娟¹, 崔婧¹, 何飞¹, 王雪¹, 李明娜¹, 杨青川¹, 康俊梅^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要:植物中的突触结合蛋白(SYT)属于钙结合蛋白家族,近年来在植物生物学研究领域备受关注。目前,仅在拟南芥中存在对SYT基因家族成员鉴定的相关报道,而豆科植物紫花苜蓿中该方面的研究仍属空白。本研究以拟南芥SYT基因家族成员为参照,运用生物信息学方法,在紫花苜蓿中成功筛选出21个SYT基因。通过对21个MsSYT、25个MtSYT和9个AtSYT蛋白进行系统发育分析,明确了它们之间的同源性,MsSYT基因被分成4个亚家族。在对MsSYT基因的分析中发现,其家族成员的理化性质存在相对差异,但是基因结构和蛋白保守基序在各亚家族之间却高度保守。进一步对MsSYT基因的顺式作用元件进行分析,结果显示其中包含光响应元件、胁迫响应元件和激素响应元件,这表明该家族基因在植物调节生长发育和应对非生物胁迫过程中发挥重要作用。同时,染色体定位和共线性分析表明,MsSYT基因在染色体上呈不均匀分布,存在两组非串联重复片段以及两组串联重复片段。实时定量PCR(RT-qPCR)检测结果表明部分MsSYT基因对盐、冷和干旱胁迫有响应,其中MsSYT8d对这3种胁迫均表现出显著响应。本研究首次系统地紫花苜蓿中的SYT基因进行了鉴定,并分析了其理化性质、进化特征和表达模式,为后续研究MsSYT基因在植物生长发育和非生物胁迫响应过程中的功能特性提供了坚实的理论依据。

关键词:突触结合蛋白;紫花苜蓿;非生物胁迫;表达分析

Identification of synaptotagmin gene family members in alfalfa and their transcript profiles under abiotic stresses

ZHANG Tian^{1,2}, LENG Hua-juan¹, CUI Jing¹, HE Fei¹, WANG Xue¹, LI Ming-na¹, YANG Qing-chuan¹, KANG Jun-mei^{1*}

1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China

Abstract: Synaptotagmin (SYT) proteins in plants belong to the calcium-binding protein family and have attracted much attention in the field of plant biology research. Members of the SYT family have been identified in *Arabidopsis thaliana*, but little is known about this gene family in the legume alfalfa (*Medicago sativa*). In this study, 21 SYT genes were identified in the alfalfa genome based on searches using *A. thaliana* SYT gene sequences. The alfalfa SYT genes were then analyzed using bioinformatics methods. Phylogenetic analysis of SYT proteins of *M. sativa*, *M. truncatula*, and *Arabidopsis* (21 MsSYTs, 25 MtSYTs, and nine AtSYTs) clarified their homologous

收稿日期:2025-04-24;改回日期:2025-08-09

基金项目:国家自然科学基金(32071868, 32371770)资助。

作者简介:张钿(1997—),女,河北邢台人,在读博士。E-mail: zt150944@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: kangjunmei@caas.cn

relationships and divided the *MsSYT* genes into four subfamilies. The putative proteins encoded by *MsSYT* genes showed some differences in their predicted physicochemical properties, but the gene structure and conserved protein motifs were highly conserved among the subfamilies. Analyses of the promoter sequences of *MsSYT* genes revealed *cis*-acting elements including light-responsive elements, stress-responsive elements, and hormone-responsive elements, indicating that *MsSYTs* plays important roles in plant growth and development and in responses to abiotic stresses. Chromosome localization analyses revealed that *MsSYT* genes were unevenly distributed among the chromosomes, and collinearity analyses detected two sets of non-tandem repeats and two sets of tandem repeats. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analyses showed that some *MsSYT* genes responded to salt stress, cold stress, and drought stress, and *MsSYT8d* responded to all three stresses. This study is the first description of *SYT* genes in alfalfa, the physicochemical properties of their putative encoded proteins, and their evolutionary characteristics and transcript profiles. These results provide a solid theoretical basis for further research on the functional characteristics of *MsSYTs* in plant growth and development and abiotic stress responses.

Key words: synaptotagmin; alfalfa; abiotic stress; expression analysis

在植物生命活动的复杂调控网络中,基因家族的功能研究一直是生物学领域的热点。植物中的 *SYT* 基因作为编码突触结合蛋白(synaptotagmin, *SYT*)基因家族的重要成员,近年来受到科研人员的广泛关注。其在植物细胞内承担着关键的生物学功能,在植物的生长发育、逆境响应以及细胞稳态维持等过程均发挥着不可或缺的作用。植物 *SYT* 基因编码的蛋白质通常包含 Ca^{2+} 结合结构域(C2 结构域),这是一个重要的钙离子结合域,可将内质网(endoplasmic reticulum, ER)与质膜(plasma membrane, PM)结合在一起,有助于调节细胞内的信号传递和膜融合过程。C2 结构域是仅次于 EF-hand 的第二大 Ca^{2+} 调节结构域,它具有高度保守的结构,由 4 股相互叠加的 8 股反平行 β 夹层构成^[1]。C2 结构域包括约 130 个残基,最早在蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)中被发现^[2-3]。虽然 C2 结构域和附件蛋白在结构上没有关联,但它们在以钙依赖方式结合磷脂方面具有共同的功能特征^[4]。在蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中,*MtSyt1*、*MtSyt2* 和 *MtSyt3* 表达于分生组织的膨大细胞、感染区和固氮区的近端细胞层,突触结合蛋白依赖的膜融合与根瘤菌的释放和共生体的成熟密切相关^[5]。既往研究证实,C2 结构域蛋白不仅参与信号转导,还参与囊泡贩运和其他细胞过程^[6]。除了 C2 结构域外,*SYT* 还含有一个突触蛋白样线粒体脂质结合蛋白(synaptotagmin-like mitochondrial lipid-binding protein, SMP)结构域,对于在 ER 和 PM 之间穿梭脂质至关重要。*SYT* 蛋白中的这些结构域能够参与膜融合事件,并在植物细胞的内膜系统中发挥关键作用^[7]。

植物中的 *SYT* 蛋白还被发现与非生物胁迫有关。例如,在水稻(*Oryza sativa*)中,*OsC2DP* 基因在盐胁迫下从细胞质转移到细胞膜,增强了植物的耐盐性^[8]。除此之外,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)*SYT* 家族中的 5 个成员(*SYT1*~*SYT5*)在非生物胁迫下如盐和低温胁迫响应中起着关键作用。特别是 *SYT1* 和 *SYT3* 在盐和冷胁迫中表现出功能冗余,*SYT1* 突变体幼苗(*syt1*) 在添加了 NaCl 和高 Ca^{2+} 的培养基中表现出生长减弱,而在添加 NaCl 和低 Ca^{2+} 的培养基中 *syt1* 表现更加敏感^[9]。与野生型(wild type, WT)拟南芥相比,NaCl 会降低 *syt1* 植物的光合作用,其叶绿素和类胡萝卜素含量也会减少,气孔关闭程度也会增加^[10]。拟南芥 *syt1* 突变株系的根系在冷胁迫下细胞死亡数量减少,而 *SYT3* 细胞死亡与野生型相似,但是与 *syt1* 相比,*syt1/syt3* 表现出更严重的细胞损伤;同样,*syt1* 成年株系在冷适应后对冷冻胁迫不敏感,而 *syt1/syt3* 则表现出更强的不敏感性,这表明 *syt1* 和 *syt3* 存在冗余功能^[11]。综上所述,这些结果证实了 *SYT1* 和 *SYT3* 在非生物胁迫响应中的关键作用。而 *SYT5* 则不参与这些胁迫的响应^[12]。这表明 *SYT* 基因家族在植物适应环境压力方面可能具有重要的作用。*SYT* 基因在植物病害抗性中也显示出重要作用。例如,辣椒(*Capsicum annuum*)中的 *CaSYT5* 基因在应答青枯病和高温高湿胁迫中起调节作用,其表达受到多种植物激素的诱导^[13]。这表明 *SYT* 基因可能通过参与植物激素信号通路来增强植物的抗病性和适应性。

SYT基因在调节植物生长发育和非生物胁迫方面有着重要作用,但是目前对其家族研究的报道相对较少。紫花苜蓿(*M. sativa*)被称为“牧草之王”,具有生物产量高、营养丰富以及适应性强等优良特性。它是一种异花授粉的同源四倍体($2n=4x=32$)豆科苜蓿属植物,起源于以伊朗为地理中心的西南亚^[14]。许多牧草生长地区的生态环境较差,这严重影响了紫花苜蓿的生长发育。紫花苜蓿的基因组相对拟南芥较为复杂,因此紫花苜蓿SYT基因家族成员更具有多样性,其功能更具有复杂性。

总之,对MsSYT基因功能的初步研究不仅有助于理解紫花苜蓿中SYT基因的调控途径,还可能为开发新的抗逆紫花苜蓿材料提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 MsSYT基因家族成员鉴定以及理化性质分析

通过查阅文献和拟南芥网站TAIR(<https://www.arabidopsis.org/>)获取AtSYT基因家族成员的蛋白质序列和拟南芥全基因组序列。利用紫花苜蓿基因组网站(<https://figshare.com/s/00771f7d12f067b8fadf>)获取基因组数据、cDNA序列、蛋白序列和注释文件。通过AtSYT蛋白质序列Blast分析得到MsSYT基因家族成员。从pfam数据库(<https://pfam-legacy.xfam.org/>)下载SYT基因家族的蛋白结构域(PF00168)对应的隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model, HMM)文件,使用hmmsearch v 3. 3. 2软件对紫花苜蓿蛋白质序列进行搜索,参数为默认。合并两种搜索方法结果,去除冗余后将候选序列提交CDD数据库(conserved domains database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>)中进行验证后确定紫花苜蓿SYT基因家族成员。同理利用上述方法确定蒺藜苜蓿家族成员。利用TBtools工具从“中苜4号”参考基因组GFF文件中获得了已鉴定的MsSYT蛋白序列长度、分子量、不稳定系数、总平均亲水性和理论等电点等。

1.2 MsSYT基因家族成员的染色体分布以及系统发育分析

MsSYT的位置信息来自苜蓿基因组数据库(<https://figshare.com/s/00771f7d12f067b8fadf>)。利用TBtools将所有MsSYT基因在染色体上的分布可视化并对其中的串联重复基因进行了分析。串联重复主要发生在染色体重组区域,串联复制形成的基因家族成员通常紧密排列在同一条染色体上,形成一个序列相似、功能相近的基因簇^[15]。利用MEGA 11软件^[16],采用邻接法(neighbor-joining, NJ),设置校验参数(bootstrap)为1000,对MtSYT、AtSYT和MsSYT蛋白进行系统发育分析。

1.3 MsSYT基因结构及保守基序分析

利用NCBI在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)提取MsSYT基因的结构文件,利用MEME^[17]在线网站(<https://meme-suite.org/meme/index.Html>)提取MsSYT基因的motif文件。使用TBtools软件对MsSYT的基因结构和motif可视化。

1.4 MsSYT基因顺式作用元件分析

从紫花苜蓿全基因组中提取MsSYT基因上游2000 bp的启动子区域序列,利用在线网站PlantCare(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[18]预测MsSYT基因启动子的顺式作用元件,并使用TBtools软件可视化。

1.5 MsSYT基因间以及与拟南芥、蒺藜苜蓿SYT基因之间的共线性分析

利用TBtools软件中的一步式MCScanX-Super fast程序^[19],对基因重复事件进行鉴定,并利用该程序检测MsSYT之间的共线区域以及与MtSYT和AtSYT之间的共线性关系。MsSYT所有功能和染色体位置信息均由TBtools软件获取。

1.6 非生物胁迫下MsSYT基因的表达模式分析

将中苜4号紫花苜蓿种子放置于带有滤纸的湿润培养皿中发芽,待其胚芽长至4~5 cm时再用营养液培养至21 d,然后对此生长状态的植株进行盐(200 mmol·L⁻¹ NaCl),干旱(15% 聚乙二醇即15% PEG)和冷(4 °C)处理,并将不进行处理的植株作为对照(CK)。取处理后和未处理不同时间段的紫花苜蓿顶端第3片复叶(0、6、12和24 h)并提取RNA进行反转录获得cDNA,通过RT-qPCR(real-time quantitative PCR)获取MsSYT的表达量数

据。本试验于 2024 年 9 月在中国农业科学院北京畜牧兽医研究所牧草创新与育种团队实验室完成。

1.7 数据分析

通过 Excel 2019 和 GraphPad Prism 软件进行 RT-qPCR 数据处理($P < 0.05$ 表示差异显著)。

2 结果与分析

2.1 *MsSYT* 基因家族成员的鉴定与理化性质分析

基于拟南芥中筛选出的 *AtSYT* 基因^[20], 通过 Blast 从紫花苜蓿中筛选出了 649 个 *MsSYT* 基因, 结合该基因成员含有的 C2 结构域, 进一步鉴定得出 21 个 *MsSYT* 基因。将这 21 个基因根据与拟南芥的系统发育关系进行命名(表 1) 并对其编码的蛋白长度、分子量以及等电点(isoelectric point, PI) 等进行了分析。结果表明 *MsSYT* 家族成员蛋白长度最长的(*MsSYT13*) 为 1323 aa, 最短的(*MsSYT2*) 为 535 aa; 分子量为 60.98~151.85 kDa, 等电点为 5.77~9.29。分析其不稳定系数发现 *MsSYT* 家族成员中不稳定的蛋白有 48%, 稳定的蛋白有 52%。该家族成员都为亲水性蛋白, 亲水能力都较高。

表 1 *MsSYT* 基因家族基本性质分析

Table 1 Analysis of the basic properties of *MsSYT* gene family

基因登录号 Gene ID	基因名称 Gene name	蛋白长度 Protein length (aa)	分子量 Molecular weight (kDa)	等电点 Isoelectric point (pI)	不稳定系数 Instability index	总平均亲水性 Grand average of hydropathicity
Msa083526.t01	<i>MsSYT1</i>	537	61.44	6.36	29.74	-0.339
Msa000097.t01	<i>MsSYT2</i>	535	60.98	7.61	32.65	-0.250
Msa005119.t01	<i>MsSYT3</i>	544	62.05	8.40	35.48	-0.091
Msa086529.t01	<i>MsSYT4</i>	821	92.00	6.92	40.18	-0.216
Msa183305.t01	<i>MsSYT5</i>	566	63.51	5.96	31.42	-0.095
Msa027845.t01	<i>MsSYT6</i>	1023	114.98	5.77	48.58	-0.267
Msa112806.t01	<i>MsSYT7</i>	764	87.85	6.67	43.22	-0.045
Msa083527.t01	<i>MsSYT8a</i>	945	107.72	6.10	38.93	-0.400
Msa083527.t02	<i>MsSYT8b</i>	645	74.41	5.86	39.96	-0.351
Msa083527.t03	<i>MsSYT8c</i>	717	82.48	6.34	39.31	-0.348
Msa083527.t04	<i>MsSYT8d</i>	645	74.41	5.86	39.96	-0.351
Msa083527.t05	<i>MsSYT8e</i>	717	82.48	6.34	39.31	-0.348
Msa038100.t01	<i>MsSYT9</i>	561	63.29	5.78	34.12	-0.099
Msa157005.t01	<i>MsSYT10</i>	775	89.45	9.20	45.43	-0.261
Msa081502.t01	<i>MsSYT11</i>	770	88.96	9.29	42.32	-0.262
Msa179019.t01	<i>MsSYT12</i>	1005	114.51	9.16	45.19	-0.387
Msa156608.t01	<i>MsSYT13</i>	1323	151.85	8.93	41.08	-0.403
Msa156589.t01	<i>MsSYT14</i>	1013	115.13	9.27	43.45	-0.371
Msa135465.t01	<i>MsSYT15</i>	828	93.71	6.90	45.36	-0.301
Msa056918.t01	<i>MsSYT16a</i>	568	64.18	5.98	33.88	-0.114
Msa056918.t02	<i>MsSYT16b</i>	1045	120.18	8.97	43.06	-0.473

2.2 *MsSYT* 基因家族成员的染色体分布以及系统发育分析

运用 TBtools 工具分析发现 *MsSYT* 家族成员不均匀地分布在 8 条染色体上(图 1), 其中第 4 条染色体上分布的基因最多, 有串联重复的 5 个基因(*MsSYT8a*、*MsSYT8b*、*MsSYT8c*、*MsSYT8d* 和 *MsSYT8e*), 而在第 2、5 和 6 条染色体上分布的基因较少, 分别仅分布一个基因(*MsSYT12*、*MsSYT7* 和 *MsSYT15*)。在第 3 条染色体上也有两个串联重复的基因(*MsSYT16a* 和 *MsSYT16b*)。

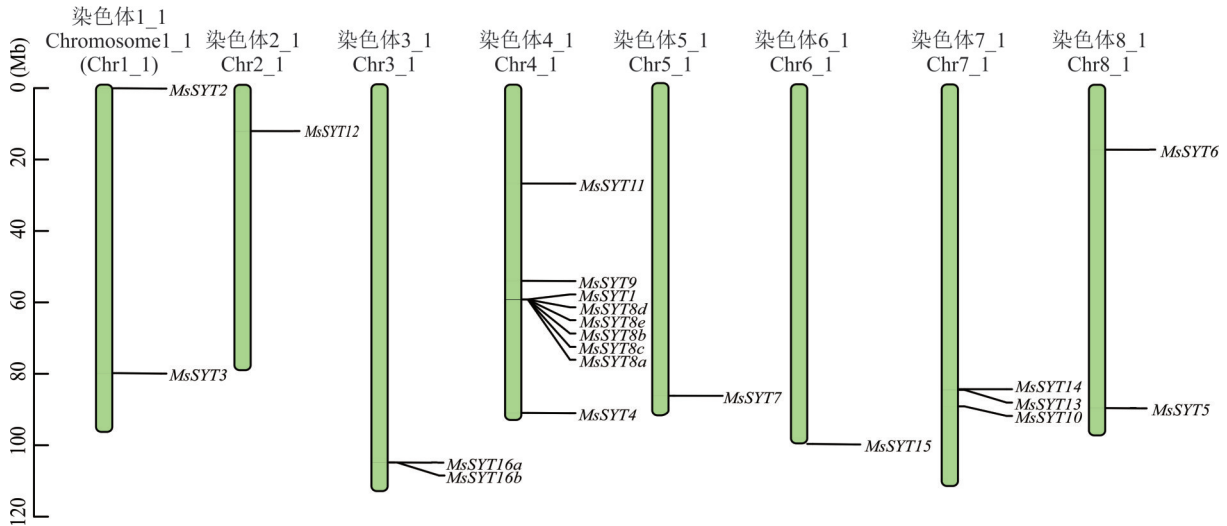


图1 *MsSYT* 基因家族成员的染色体分布
 Fig. 1 Chromosomal distribution of *MsSYT* gene family members

通过MAGE 11分析了21个紫花苜蓿、9个拟南芥和25个蒺藜苜蓿SYT家族成员之间的系统发育关系(图2),结果表明3个物种的所有基因(55个)被分成了4组,其中I组有10个基因,9个都是*MtSYT*家族成员;II组有14个基因,只包含*MtSYT*和*MsSYT*基因;III组基因最多,有16个基因;IV组有15个基因,紫花苜蓿SYT基因最多。

2.3 *MsSYT* 基因的保守基序、保守结构域及结构分析

利用TBtools软件和MEME在线网站对*MsSYT*基因保守基序、保守结构域及基因结构进行了分析。结果发现*MsSYT*基因核酸序列较长,并且长度不一致,*MsSYT7*、*MsSYT9*、*MsSYT10*、*MsSYT11*、*MsSYT12*和

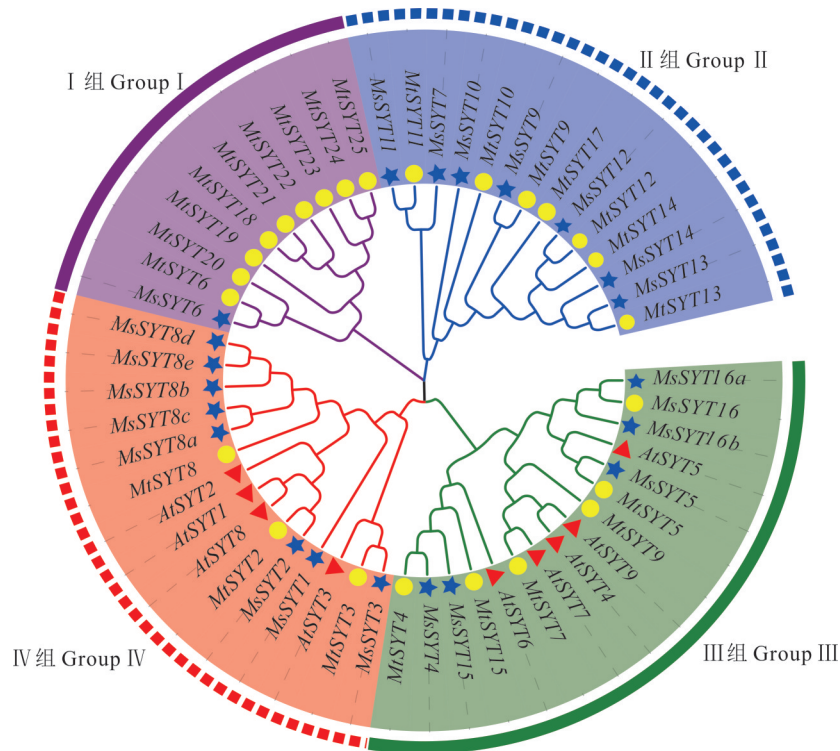


图2 紫花苜蓿、拟南芥和蒺藜苜蓿的SYT家族成员系统发育关系
 Fig. 2 Phylogenetic relationships of SYT gene family in *M. sativa*, *A. thaliana* and *M. truncatula*

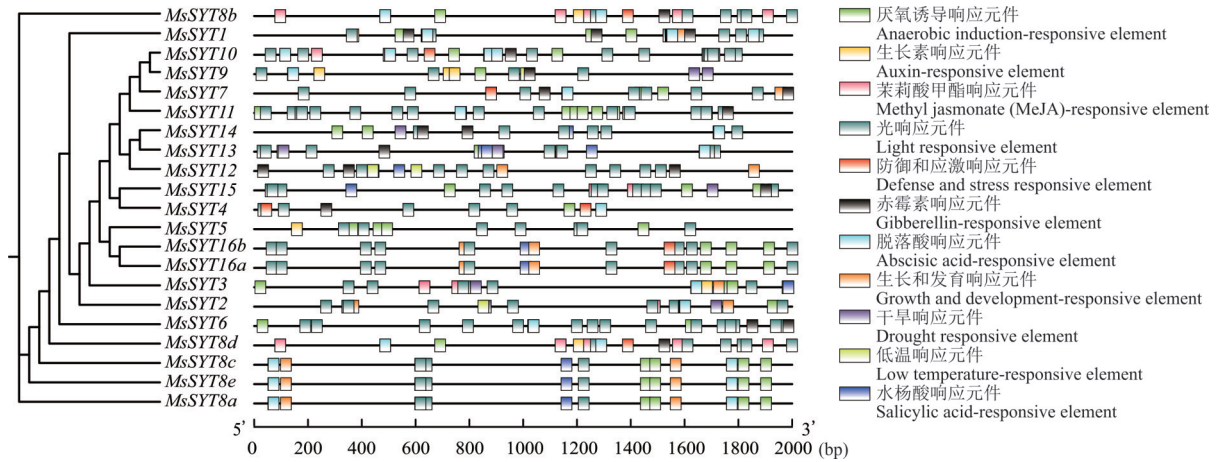


图4 *MsSYT* 家族成员的顺式作用元件分析

Fig. 4 Analysis of cis-acting elements of *MsSYT* family members

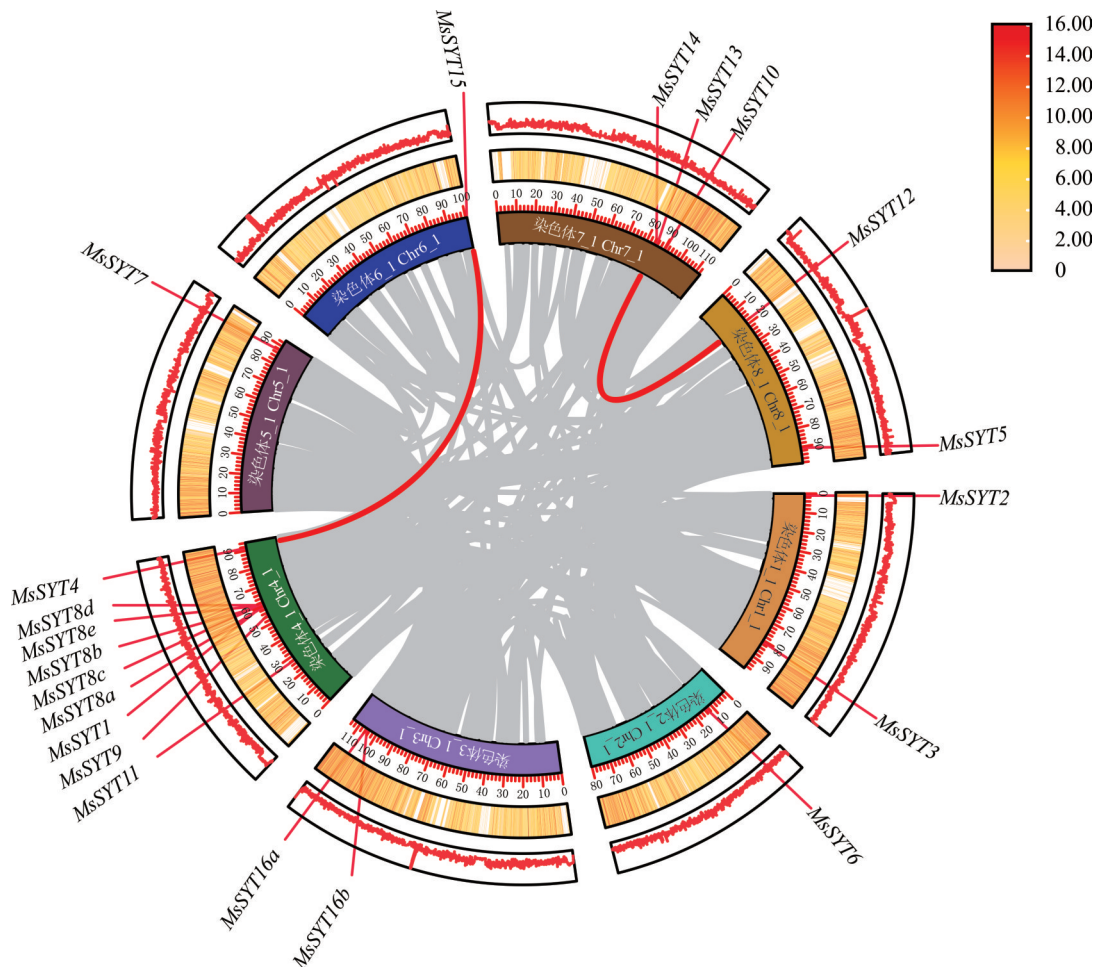


图5 紫花苜蓿 *MsSYT* 基因的共线性分析

Fig. 5 Collinearity analysis of *MsSYT* gene in *M. sativa*

中有 2 对片段重复,但不是串联重复(图 5)。来自不同染色体的 *MsSYT* 同源物(如 *MsSYT12* 和 *MsSYT13*)具有较高的序列同一性。上述结果表明,片段重复可能有助于 *MsSYT* 的扩增。来自同一染色体的 *MsSYT* 家族成员中有两个串联重复的片段,分别是 *MsSYT8a*, *MsSYT8b*, *MsSYT8c*, *MsSYT8d* 和 *MsSYT8e* 与 *MsSYT16a* 和 *MsSYT16b*。这表明 *MsSYT* 基因发生了复制且保守性较高。

对拟南芥、蒺藜苜蓿和紫花苜蓿分别进行了共线性分析,蒺藜苜蓿(17对)与紫花苜蓿 *SYT* 同源性的基因多于拟南芥(6对),这表明紫花苜蓿与同一科属的植物蒺藜苜蓿 *SYT* 基因的同源性更高,在功能上可能更相似(图6)。

2.6 非生物胁迫下 *MsSYT* 基因的表达模式分析

为了解 21 个 *MsSYT* 基因是否参与非生物胁迫的响应,本研究从该家族基因中随机选取了 6 个基因,对其在 3 种非生物胁迫处理(干旱、盐和冷)下的表达模式进行了分析。其中在干旱胁迫下 *MsSYT6*、*MsSYT8d* 和 *MsSYT11* 基因的表达水平随着时间的延长均显著高于对照组($P < 0.01$),*MsSYT2* 和 *MsSYT8a* 只在部分时间段响应干旱胁迫。而 *MsSYT15* 在干旱胁迫下表达水平并未发生显著变化(图7, $P > 0.05$)。

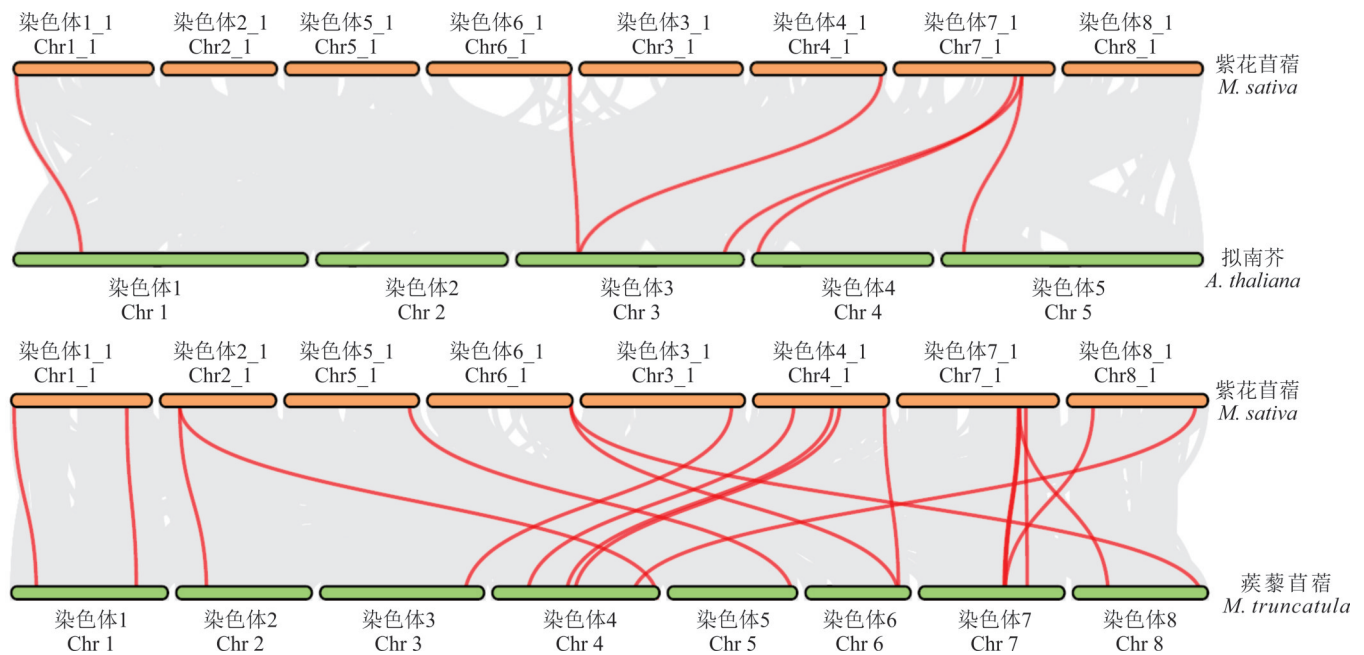


图6 紫花苜蓿与拟南芥、蒺藜苜蓿 *SYT* 基因的共线性分析

Fig. 6 Collinearity analysis of *SYT* genes in *M. sativa*, *A. thaliana* and *M. truncatula*

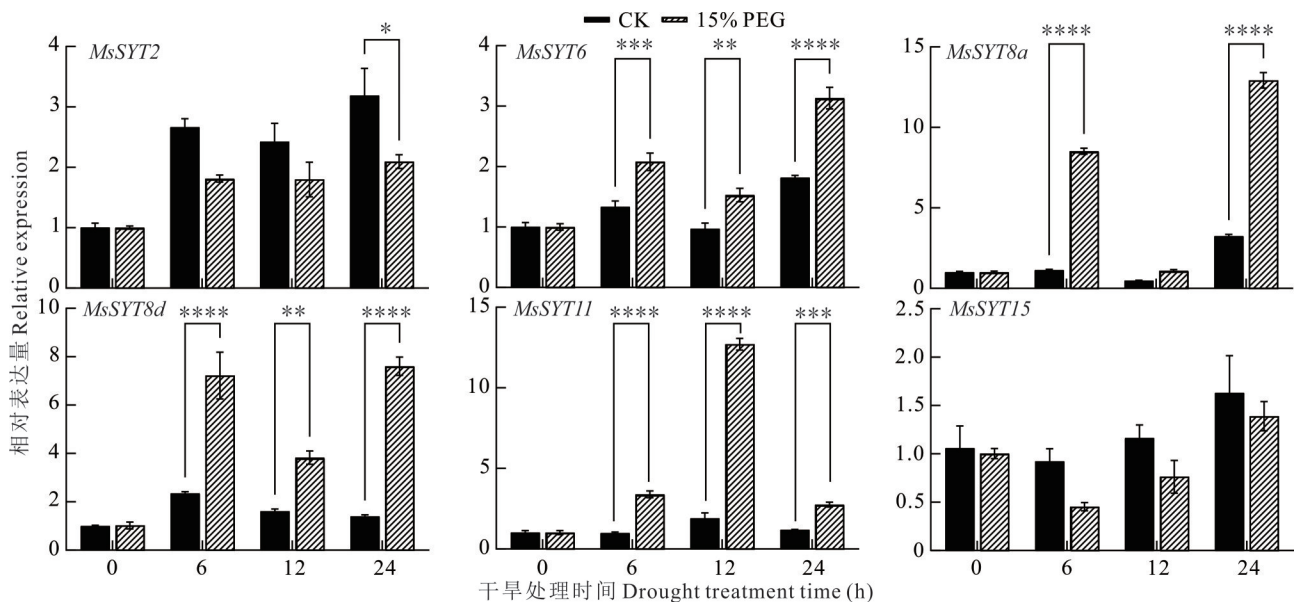


图7 *MsSYT* 基因在干旱胁迫下的表达模式

Fig. 7 Expression pattern of *MsSYT* gene under drought stress

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; 下同 The same below.

在盐胁迫下(图8),*MsSYT8d*在24 h内的3个时刻(6、12和24 h)表达水平都发生了显著变化,并且在6 h时,表达量显著降低,仅为对照组的5%。*MsSYT2*、*MsSYT11*和*MsSYT15*仅在一个时间段内响应盐胁迫,相比于对照*MsSYT2*在12 h时表达水平显著降低,*MsSYT11*和*MsSYT15*分别在24和12 h时表达水平显著升高。而*MsSYT6*的表达水平在盐胁迫下并没有发生显著变化($P < 0.05$),可能在短期内并不响应盐胁迫。

在冷胁迫下(图9),*MsSYT2*和*MsSYT11*随着胁迫时间的延长其表达水平逐渐上升,并且在24 h时表达水平都显著高于正常情况。*MsSYT6*、*MsSYT8a*和*MsSYT8d*表达水平相比于对照都发生了显著变化,其中*MsSYT8d*在不同胁迫时间下表达水平都有显著变化,而其他基因仅在某个时刻表达水平有显著变化。总体来看,*MsSYT8d*显著响应这3种非生物胁迫。

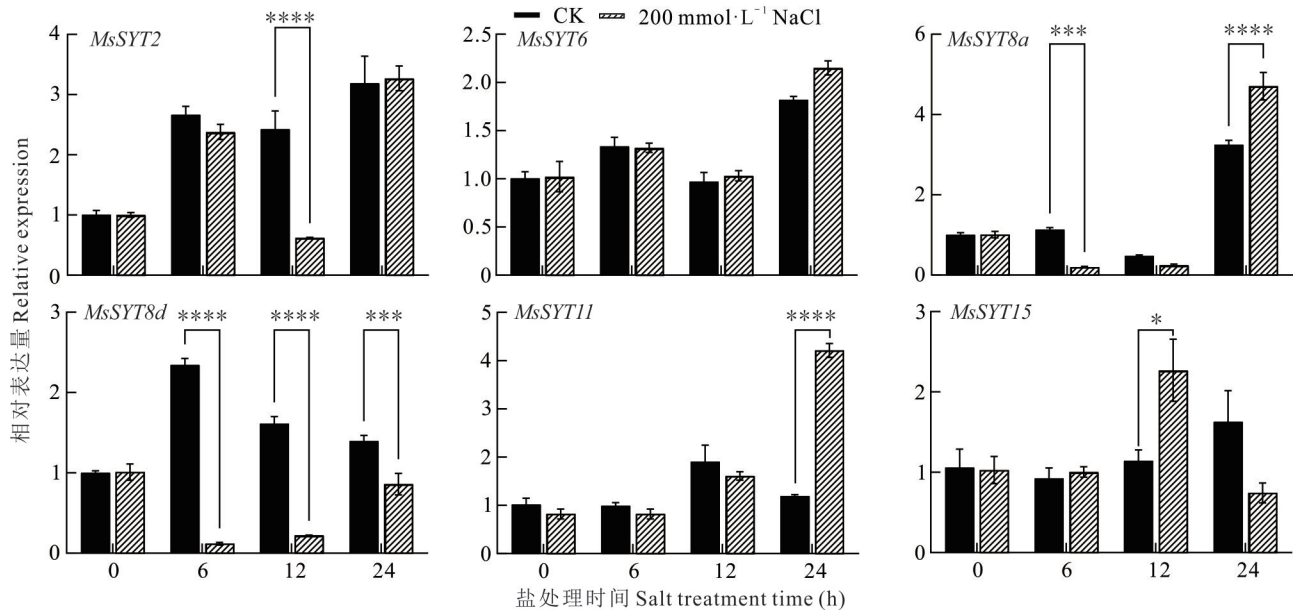


图8 *MsSYT*基因在盐胁迫下的表达模式

Fig. 8 Expression pattern of *MsSYT* gene under salt stress

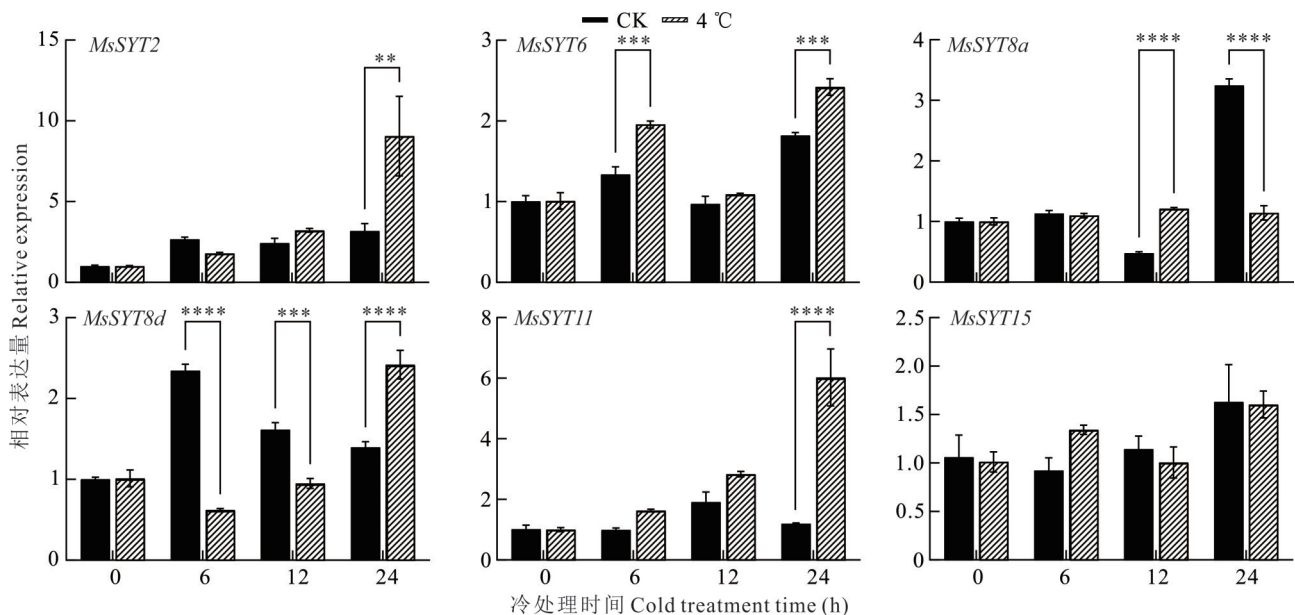


图9 *MsSYT*基因在冷胁迫下的表达模式

Fig. 9 Expression pattern of *MsSYT* gene under cold stress

3 讨论

在哺乳动物中最先发现了 SYT 蛋白,它是一种与 Ca^{2+} 依赖性胞吐控制作用有关的基因家族产物。同其他真核生物一样,关于植物 SYT 的认知也来自对酵母和哺乳动物同源物的研究:分别是三尖杉蛋白(Tcbs)和扩展突触柄蛋白(E-Syts)^[21]。C2 结构域在 SYT 家族基因中也普遍存在,它们的 C 端或 N 端含有单个或多个 C2 结构域。它在跨膜区具有更高的功能活性,通过分析其保守的蛋白质结构域^[8]发现紫花苜蓿 SYT 家族成员中含有两个以上特殊蛋白(图 3)。拟南芥 SYT 家族有 5 个成员(SYT1~SYT5)。SYT7 被认为是该家族的新成员,但它缺少第 2 个 C2 结构域,取而代之的是一个线圈结构域^[22],但是本研究在拟南芥中共发现了 9 个 SYT 基因(图 2)。以往少见对蒺藜苜蓿 SYT 家族基因鉴定的研究,所以本研究利用筛选紫花苜蓿家族基因的方法筛选了蒺藜苜蓿 SYT 家族基因。这一推测为后续深入研究 MsSYT2 基因在紫花苜蓿应对非生物胁迫过程中的具体功能和作用机制提供了方向。SYT 成员的表达模式各不相同^[11]:SYT1、SYT3、SYT5 和 SYT7 在不同组织中都有表达,而 SYT2 和 SYT4 则分别在花粉和根等特定的器官中表达。其中,SYT1 的表达量最高,其次是 SYT5^[11,22]。并且 AtSYT1 是该家族成员中功能最明晰的基因,该基因的功能缺失突变体在非生物胁迫反应中表现出多种响应,包括盐^[25]、冷和外部损伤,也会对生物胁迫产生影响,如改变对病毒和真菌的抗性。根据拟南芥 SYT 家族分类,21 个 MsSYT 基因被分为 4 大类(I、II、III 和 IV 组)。在紫花苜蓿中,与 AtSYT1 亲缘关系最近的 MsSYT2 在干旱、盐和冷胁迫下表达水平也发生了变化,因此,推测 MsSYT2 基因响应干旱、盐和冷胁迫。

基因启动子是位于基因编码区上游的 DNA 序列,其中包含多个顺式作用元件,这些元件是参与启动和调控转录蛋白质的特异性结合位点^[26]。本研究中,根据 21 个 MsSYT 基因的启动子序列预测了其顺式作用元件(图 4),发现启动子区域含有多种响应元件,如对非生物胁迫和植物激素的响应元件,其中光响应元件和厌氧诱导响应元件分布更广泛,这也表明紫花苜蓿 SYT 基因可参与植物生长、发育和激素调节。此外,MsSYT 基因家族成员在进化过程中存在基因重复现象,如存在两组非串联重复片段以及两组串联重复片段。基因重复通常为基因进化和新功能的产生提供原材料^[24],这使得 MsSYT 基因家族在紫花苜蓿适应复杂的环境过程中,可能通过基因功能分化或冗余,更好地发挥应对非生物胁迫的功能。例如,串联重复的 MsSYT8 基因簇,虽然它们具有较高的序列相似性,但在不同胁迫下的表达模式仍存在差异,表明它们可能在功能上既有重叠又有所分化,能协同应对不同的环境挑战。

然而,目前关于紫花苜蓿 SYT 基因具体的功能和作用机制仍有待进一步探究。后续可通过基因编辑技术,如 CRISPR/Cas9 技术,对特定的 MsSYT 基因进行敲除或过表达,观察植株在非生物胁迫下的表型变化,深入解析其功能;也可以利用蛋白质组学和代谢组学技术,全面分析 MsSYT 基因调控的下游信号通路和代谢途径,从而更系统地揭示紫花苜蓿 SYT 基因在植物生长发育和应对非生物胁迫中的作用机制。

4 结论

本研究从基因结构、进化关系、同源分析和表达模式等不同层面分析了紫花苜蓿 SYT 基因的系统发育和生物功能的多样化。最终在“中苜 4 号”紫花苜蓿基因组中鉴定出 21 个 MsSYT 基因,其中有两组非串联重复的片段,以及两组串联重复的片段。系统发育分析把这些基因分成了 4 个组(I、II、III 和 IV),每组基因的蛋白理化性质均有差异。表达模式分析结果最终表明 MsSYT8d 响应短时间内的干旱、盐和冷胁迫,而其他 5 个基因在不同胁迫下有不同的表达水平。这为今后研究紫花苜蓿 SYT 基因在植物非生物胁迫中的功能和作用机制提供了理论依据。

参考文献 References:

- [1] Hinderliter A K, Almeida P F F, Biltonen R L, *et al.* Membrane domain formation by calcium-dependent, lipid-binding proteins: Insights from the C2 motif. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1998, 1448(2): 227–235.
- [2] Guerrero-Valero M, Marín-Vicente C, Gómez-Fernández J C, *et al.* The C2 domains of classical PKCs are specific ptdIns(4,5)P₂-sensing domains with different affinities for membrane binding. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 371(3): 608–621.
- [3] Xiao S P, Wu C C, Zuo D Y, *et al.* Systematic analysis and comparison of *CaLB* genes reveal the functions of *GhCaLB42* and

- GhCaLB123* in fiber development and abiotic stress in cotton. *Industrial Crops and Products*, 2022, 184: 115030.
- [4] Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 1988, 334(6184): 661–665.
- [5] Gavrin A, Kulikova O, Bisseling T, *et al.* Interface symbiotic membrane formation in root nodules of *Medicago truncatula*: The role of synaptotagmins *MtSyt1*, *MtSyt2* and *MtSyt3*. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 201.
- [6] Zhang D P, Aravind L. Identification of novel families and classification of the C2 domain superfamily elucidate the origin and evolution of membrane targeting activities in eukaryotes. *Gene*, 2010, 469(1): 18–30.
- [7] Benavente J L, Siliqi D, Infantes L, *et al.* The structure and flexibility analysis of the *Arabidopsis* synaptotagmin 1 reveal the basis of its regulation at membrane contact sites. *Life Science Alliance*, 2021, 4(10): e202101152.
- [8] Zhang H J, Zeng Y T, Seo J, *et al.* Global identification and characterization of C2 domain-containing proteins associated with abiotic stress response in rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4): 2221.
- [9] Schapire A L, Voigt B, Jasik J, *et al.* *Arabidopsis* synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. *The Plant Cell*, 2008, 20(12): 3374–3388.
- [10] Krausko M, Kusá Z, Peterková D, *et al.* The absence of the *AtSYT1* function elevates the adverse effect of salt stress on photosynthesis in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1751.
- [11] Ruiz-Lopez N, Pérez-Sancho J, del Valle A E, *et al.* Synaptotagmins at the endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites maintain diacylglycerol homeostasis during abiotic stress. *The Plant Cell*, 2021, 33(7): 2431–2453.
- [12] García-Hernández S, Rubio L, Rivera-Moreno M, *et al.* Functional and structural analysis reveals distinct biological roles of plant synaptotagmins in response to environmental stress. *Plant, Cell & Environment*, 2025, 48(1): 260–271.
- [13] Wang R Z. The functional analysis of *CaSYT5* in pepper's response to *Relstonia solanacearum* or high-temperature-high-humidity challenge. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017.
王榕樟. *CaSYT5*在辣椒应答青枯病和高温高湿过程中的功能分析. 福州: 福建农林大学, 2017.
- [14] Sun Q Z, Liu Q, Li F, *et al.* A brief review of the origin and dissemination of alfalfa. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(6): 204–212.
孙启忠, 柳茜, 李峰, 等. 苜蓿的起源与传播考述. *草业学报*, 2019, 28(6): 204–212.
- [15] Holub E B. The arms race is ancient history in *Arabidopsis*, the wildflower. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(7): 516–527.
- [16] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022–3027.
- [17] Bailey T L, Williams N, Misleh C, *et al.* MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: W369–W373.
- [18] Lescot M, Déhais P, Thijs G, *et al.* PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 325–327.
- [19] Wang Y, Tang H, DeBarry J D, *et al.* MCScanX: A toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(7): e49.
- [20] Craxton M. Genomic analysis of synaptotagmin genes. *Genomics*, 2001, 77(1/2): 43–49.
- [21] Benitez-Fuente F, Botella M A. Biological roles of plant synaptotagmins. *European Journal of Cell Biology*, 2023, 102(3): 151335.
- [22] Ishikawa K, Tamura K, Fukao Y, *et al.* Structural and functional relationships between plasmodesmata and plant endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites consisting of three synaptotagmins. *New Phytologist*, 2020, 226(3): 798–808.
- [23] Lynch M, Conery J S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 2000, 290(5494): 1151–1155.
- [24] Cannon S B, Mitra A, Baumgarten A, *et al.* The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 2004, 4(1): 10.
- [25] Gao B. Response of the *Arabidopsis* SYTA to salt stress. Jinan: Shandong Normal University, 2011.
高彬. 拟南芥 SYTA 基因在盐胁迫响应中的功能研究. 济南: 山东师范大学, 2011.
- [26] Hernandez-Garcia C, Finer J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science*, 2013, 217–218: 109–119.